

METHOD FOR EXCLUDING INFLUENCE BY OXIDIZER

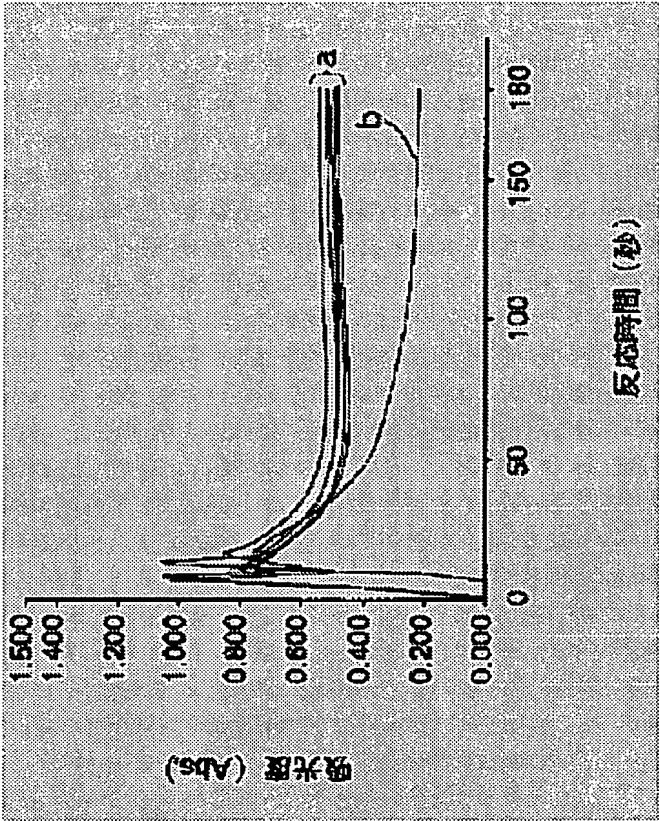
Patent number: JP2000097927
Publication date: 2000-04-07
Inventor: KOMORI TANEKI; YONEHARA SATOSHI
Applicant: KYOTO DAIICHI KAGAKU KK
Classification:
- international: C12Q1/26; C12Q1/54; G01N1/28; G01N21/77; G01N31/00; G01N33/48;
C12Q1/26; C12Q1/54; G01N1/28; G01N21/77; G01N31/00; G01N33/48;
(IPC1-7): G01N1/28; G01N31/00; C12Q1/26; C12Q1/54; G01N21/77;
G01N33/48
- european:
Application number: JP19980265275 19980918
Priority number(s): JP19980265275 19980918

BEST AVAILABLE COPY

Report a data error here

Abstract of JP2000097927

PROBLEM TO BE SOLVED: To achieve a method for excluding influence of an oxidizer that is added to eliminate the action of a reducing substance in a sample in a measurement method using an oxidation reduction reaction. SOLUTION: When an oxidizer is added to a sample, the influence of a reducing substance in the above sample is excluded, and then a treating agent such as Bicine is added to it, the influence of an excessive amount of oxidizer can be excluded for accurate measurement. When the amount of hydrogen peroxide in the sample is to be measured, iodine acetic sodium is added to the above sample as an oxidizer, the influence of the reducing substance in the above sample is excluded, and a Bicine treatment liquid is added to a mixed liquid between the above sample and the iodine acetic sodium as the treatment liquid, thus excluding the influence of the above iodine acetic sodium. Then, peroxidase and DA-64 are added to it, the oxidation reduction reaction with the above hydrogen peroxide is made, and the above DA-64 develops color. By this method, the amount of hydrogen peroxide can be measured more accurately than before as shown in the figure.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-97927

(P2000-97927A)

(43) 公開日 平成12年4月7日(2000.4.7)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
G 0 1 N 31/00		C 0 1 N 31/00	Y 2 G 0 4 2
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	2 G 0 4 3
1/54		1/54	2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/77		G 0 1 N 21/77	Z 4 B 0 6 3
33/48		33/48	A
審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-265275

(22) 出願日 平成10年9月18日(1998.9.18)

(71) 出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 小森 胤樹

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 米原 聡

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(74) 代理人 100095555

弁理士 池内 寛幸 (外1名)

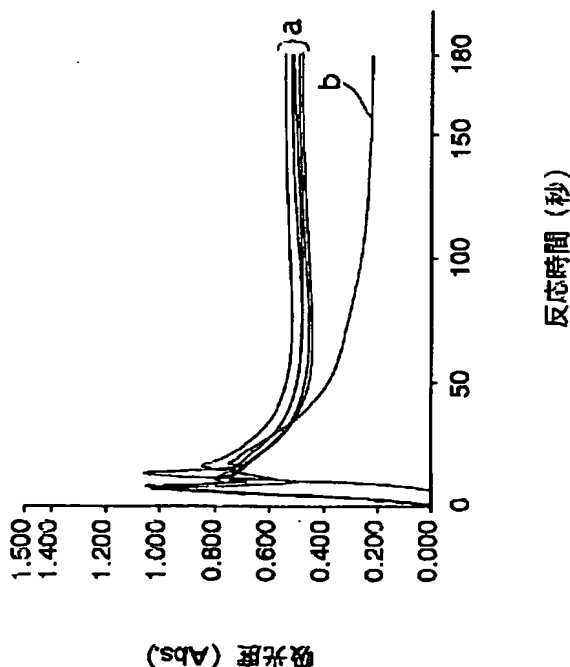
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酸化剤による影響を排除する方法

(57) 【要約】

【課題】 酸化還元反応を用いた測定方法において、試料中の還元物質の作用を消去するために添加した酸化剤による影響を排除する方法を提供する。

【解決手段】 試料に酸化剤を添加して、前記試料中の還元物質の影響を排除した後、これにBicine等の処理剤を添加すれば、過剰量の酸化剤による影響を排除でき、正確な測定が行える。試料中の過酸化水素量を測定する場合は、前記試料に、酸化剤としてヨード酢酸ナトリウムを添加して、前記試料中の還元物質の影響を排除した後、前記試料とヨード酢酸ナトリウムとの混合液に、処理剤としてBicine処理液を添加することにより、前記ヨード酢酸ナトリウムの影響を排除する。そして、これにペルオキシダーゼとDA-64とを添加して、前記過酸化水素との酸化還元反応を行い、前記DA-64を発色させる。この方法によれば、図1に示すように、従来よりも正確に過酸化水素量を測定できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の還元物質の作用を消去するために添加した酸化剤による影響を排除する方法であって、Bicine、TES、HEPES、HEPPSO、DIPSO、POPSO、EPPS、グリシルグリシン、トリス、TAPSO、PIPES、TAPS、Tricine、MOPSO、ACES、MOPS、ADA、BESおよびリン酸塩からなる群から選択された少なくとも一つの処理剤を前記試料に添加することにより、前記酸化剤による影響を排除する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、試料中の還元物質の作用を消去するために添加した酸化剤による影響を排除する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から、酸化還元反応等を利用して試料中の物質を測定することは、広く実施されており、例えば、生化学分析や臨床検査等でのグルコースや糖タンパク質等の測定にも適用されている。

【0003】血液や尿中等のグルコースは、糖尿病の診断や治療における重要な指標とされており、前記グルコースは、例えば、つぎのようにして測定することができる。

【0004】まず、試料中のグルコースを、酸素および水の存在下で、グルコースオキシダーゼにより処理して、過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は、前記試料中のグルコース量に対応する。そして、この試料に、ペルオキシダーゼ(POD)および還元剤を添加し、前記過酸化水素と還元剤との間で酸化還元反応を起こす。この時、前記還元剤として酸化によって発色するような還元剤(以下、「発色性基質」ともいう)を用いれば、この発色を測定することにより前記過酸化水素量を測定でき、この結果、前記試料中のグルコースの量を知ることができる。

【0005】また、前記グルコースの他に、血液中の糖タンパク質、特に、赤血球中のヘモグロビンA1c(HbA1c)も、生体内血糖値の過去の履歴を反映しているため、糖尿病診断等の重要な指標とされている。このHbA1cは、例えば、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(FAOD)処理により過酸化水素を発生させ、これを前記グルコースの測定と同様に、酸化還元反応を利用することによって測定できる。

【0006】しかし、生体試料中には、通常、還元物質が存在するため、これが酸化還元反応に影響を及ぼす。例えば、血液中には、グルタチオン(GSH)やアスコルビン酸(AsA)等の各種還元物質が存在する。このように、試料中に還元物質が存在すると、前記過酸化水素が前記還元物質で還元されたり、また前記PODが触媒する酸化還元反応が阻害され、正確に試料中の測定対

象物を測定できない。

【0007】この問題を解決するために、試料に種々の酸化剤を添加することによって、前記試料中の還元物質の影響を排除することが検討されている。しかし、前記還元物質の影響を排除するために過剰量添加した酸化剤が、一方では、酸化還元反応等に影響を及ぼすため、前記試料中の測定対象物を正確に測定できないおそれがある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明の目的は、試料中の還元物質の作用を消去するために添加した前記酸化剤による影響を排除する方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するために、本発明の方法は、試料中の還元物質の作用を消去するために添加した酸化剤による影響を排除する方法であって、Bicine、TES、HEPES、HEPPSO、DIPSO、POPSO、EPPS、グリシルグリシン、トリス、TAPSO、PIPES、TAPS、Tricine、MOPSO、ACES、MOPS、ADA、BESおよびリン酸塩からなる群から選択された少なくとも一つの処理剤を前記試料に添加することにより、前記影響を排除する方法である。

【0010】本発明者らは、試料中に添加した酸化剤の影響を排除することを目的に、一連の研究を行った結果、前記試料に添加した酸化剤に、前記処理剤をさらに添加すれば、前記酸化剤による影響を排除できることを見出し、本発明に至った。この方法によれば、試料中の測定対象物を正確に測定することが可能である。なお、前記処理剤の添加により前記酸化剤の影響を排除できる理由は、不明である。

【0011】前記処理剤のそれぞれの正式名称(化合物名)を下記に示す。

Bicine: N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン

TES: N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸

HEPES: N-2-ヒドロキシエチルピペラジーン-N'-2-エタンスルホン酸

HEPPSO: N-2-ヒドロキシエチルピペラジーン-N'-3-プロパンスルホン酸

DIPSO: 3-[N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸

POPSO: ピペラジーン-N, N'-ビス(2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸)

EPPS: 3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペテジニル]プロパンスルホン酸

トリス: トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン

TAPSO : N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸

PIPES : ピペラジン-1, 4-ビス(2-エタンスルホン酸)

TAPS : N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸

Tricine : N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン

MOPSO : 3-(N-モルホリノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸

ACES : N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸

MOPS : 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸

ADA : N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸

BES : N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸

【0012】なお、これらの処理剤は、単独で使用しても、二種類以上を併用してもよい。

【0013】本発明の方法において、前記酸化剤としては、例えば、ヨード酢酸ナトリウム、ヨード酢酸、ヨードアセトアミド、p-クロロメルクリ安息香酸(PCM B)、p-メルクリ安息香酸(PMB)、p-メルクリベンゼンスルホン酸(PMBS)等が使用できる。

【0014】本発明の方法において、前記酸化剤としては、ヨード酢酸ナトリウムを、前記処理剤としては、B icineをそれぞれ用いることが好ましい。

【0015】本発明の方法において、前記還元物質および酸化剤のそれぞれの影響の排除は、前記各影響の全部排除であってもよいし、一部排除であってもよい。すなわち、実質的にそれぞれの影響が排除されればよい。

【0016】本発明の方法は、試料中の還元物質が問題となる測定方法であれば、特に制限されず、例えば、酸化還元反応を用いた測定方法、ポテンシオメトリーによる測定方法等、またはこれらの測定方法に用いる試料の前処理方法等に好ましく適用できる。

【0017】また、本発明の方法において、前記酸化剤と処理剤とを前記試料に添加するのは、例えば、酸化還元反応やポテンシオメトリーによる反応等の前であれば、特に制限されないが、例えば、酸化還元反応を用いた測定方法に適用する場合、前記酸化還元反応の基質となる酸化物が試料に存在する前に行うことが好ましい。

【0018】また、本発明の方法において、前記酸化剤と処理剤との前記試料への添加順序は、特に制限されないが、例えば、前記酸化剤を前記試料に添加した後、この混合液に前記処理剤を添加することが好ましい。この順序によれば、前記酸化剤によって前記試料中の還元物質の影響を十分に排除した後、前記処理剤によって前記酸化剤の影響を排除することができるため、前記両影響を効率よく排除でき、試料中の測定対象物をより正確に

測定できる。この他にも、例えば、前記酸化剤と処理剤とを同時に前記試料に添加してもよいし、また、前記処理剤を前記試料に添加した後、この混合液に酸化剤を添加してもよい。

【0019】本発明の方法において、例えば、試料中に前記処理剤が存在する条件で、酸化還元反応等を用いた測定を行うことが好ましい。前記処理剤の存在下で酸化還元反応を行えば、この酸化還元反応に対する前記酸化剤の影響を確実に排除できるからである。また、前記酸化還元反応に限定されず、前記処理剤が存在する条件で、ポテンシオメトリー反応等により測定してもよい。

【0020】

【発明の実施の形態】つぎに、本発明の方法について、血球中の糖タンパク質を測定した例をあげて説明する。なお、前記糖タンパク質の測定は、溶血試料に本発明を用いた前処理を行うことにより、還元物質および酸化剤の影響を排除した後、FAOD処理によって生成した過酸化水素を、酸化還元反応を用いて測定することによって行える。

【0021】まず、全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離し、これを溶血する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用できる。このなかで、操作の簡便性等の理由から、界面活性剤を用いる方法が好ましい。

【0022】前記界面活性剤としては、例えば、Triton X-100、Tween-20、Brij 35等が使用できる。

【0023】つぎに、前記溶血試料に対し、前記酸化剤および前記処理剤によって、本発明を用いた前処理を行う。まず、前記溶血試料に前記酸化剤を混合する。

【0024】前記酸化剤は、そのまま使用してもよいが、操作の簡便性や処理の効率等の点から、酸化剤溶液として使用することが好ましい。また、その添加濃度は、試料の種類等により適宜決定されるが、試料中の還元物質の影響を完全に排除できるように、過剰濃度であることが好ましい。

【0025】そして、予め前記処理剤を水に溶解した溶液(以下「処理液」という)を調製し、前記試料と酸化剤との混合液に、前記処理液を添加する。なお、前記処理液は、緩衝能を有するため、後述する各種酵素反応において、緩衝液としてそのまま使用できる。このため、前記処理液は、pH 7~8の範囲の緩衝液であることが好ましい。

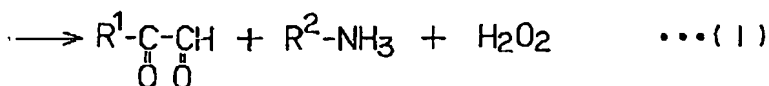
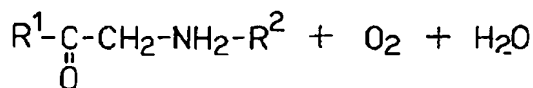
【0026】また、前記処理液の添加濃度は、前記酸化剤の添加濃度等により適宜決定されるが、前記酸化剤の影響を完全に排除できるように、過剰濃度であることが好ましい。前記処理液は、単独使用でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

【0027】なお、前述のように、前記溶血試料に対す

る、前記酸化剤および処理剤の添加順序は、特に制限されない。

【0028】具体例として、Bicineとヨード酢酸ナトリウムとを用いた前処理は、次のようにして行う。まず、pH7～8、濃度0.1～0.5mol/リットルであるBicine処理液を調製する。そして、前記溶血試料0.5～1mlに、濃度0.5～1重量%のヨード酢酸ナトリウム溶液0.1～0.5mlを加えて混合してから、この混合液に前記Bicine処理液を加えて混合し、前処理を行う。この前処理温度は、通常、30～37℃の範囲である。

【0029】つぎに、この前処理済みの試料に対し、プ



【0032】この反応は、通常、水および酸素の存在下で起こるため、過酸化水素が生成する。

【0033】つぎに、前記FAOD処理で生じた過酸化水素を、PODおよび還元剤を用いた酸化還元反応を利用して測定する。

【0034】前記還元剤としては、先に述べたように発色性基質を使用することが好ましい。前記発色性基質としては、例えば、DA-64、オルトフェニレンジアミン(OPD)、トリンダー試薬とアミノアンチピリンを組み合わせた還元剤等があげられ、特に好ましくはDA-64である。前記酸化還元反応は、通常、緩衝液中で行われ、その条件は、過酸化水素濃度等により適宜決定される。通常、反応液中のPOD濃度1～1000IU/リットル、反応温度20～37℃、反応時間1～5分、pH6～9である。また、前記緩衝液は、例えば、新たにトリス塩酸緩衝液、EPPS緩衝液、PIPES緩衝液等を調製して使用してもよいが、操作の簡便性等の点から、前述のように、先に添加した前記処理液を、そのまま緩衝液として用いることが好ましい。

【0035】前記酸化還元反応において、例えば、発色性基質を用いた場合は、その発色(反応液の吸光度)を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の濃度を測定でき、これから試料中の糖タンパク質濃度を知ることができる。

【0036】この測定方法において、前記試料の前処理工程は、前述のように、酸化還元反応前であれば、特に制限されないが、前記FAOD処理後に過酸化水素が発生することから、前記FAOD処理の前に行うことが好ましい。

【0037】また、この測定方法において、各処理工程

ロテアーゼ処理を行う。これは、FAODが、タンパク質や長鎖ペプチドに作用し難いため、予め、前記試料中の糖タンパク質のタンパク質部分をアミノ酸や短鎖ペプチドに分解するためである。

【0030】つぎに、前記プロテアーゼ処理した試料を、FAODで処理する。このFAOD処理により、下記式(1)に示す反応が触媒される。下記式(1)において、R¹は、糖のアルドース残基を示し、R²はタンパク質、ペプチドまたはアミノ酸を示す。

【0031】

【化1】

は、前述のように別々に行ってもよいが、同時に行ってもよい処理工程がある。例えば、FAOD処理と酸化還元処理は同時に行うことができる。すなわち、プロテアーゼ処理済みの試料に、例えば、FAOD、PODおよび発色性基質を同時に添加し、一定時間反応させたのち、反応液の吸光度を測定してもよい。この他に、界面活性剤による溶血処理と、プロテアーゼ処理とを同時に行うことも可能である。

【0038】このように、本発明の方法を適用すれば、還元物質を含む試料であっても、酸化還元反応等を用いて、測定対象物を高精度で測定できる。本発明の方法を適用できる試料は、前記血球に限定されず、この他に、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等があげられる。

【0039】また、本発明の方法において、その影響が排除の対象となる試料中に存在する還元物質は、特に限定されず、例えば、GSH、AsA、ジチオスレイトール、システイン、N-アセチルシステイン等があげられる。

【0040】

【実施例】つぎに、本発明の実施例について、比較例と併せて説明する。

【0041】(実施例1および比較例1)この実施例は、GSHにヨード酢酸ナトリウムとBicineとを添加して、前記GSHの影響およびヨード酢酸ナトリウムの影響を排除した例である。この実施例で用いた試薬等の組成および酸化還元反応を用いた測定の操作方法を下記に示す。

【0042】(GSH溶液)純水に、GSH(G-4251、SIGMA社製、以下同じ)を0.1mmol/

リットルの濃度になるように添加して調製した。

【0043】(ヨード酢酸ナトリウム溶液) 純水に、ヨード酢酸ナトリウム(アルドリッチ社製、以下同じ)を1.0mmol/リットルの濃度になるように添加して調製した。

POD(東洋紡社製)

DA-64(和光純薬社製)

【0046】(処理液) 0.5M Bicine 処理液(pH8.0: 同仁化学社製、以下同じ)

【0047】(操作方法) 前記Bicine 処理液0.4ml に対して、前記酸化還元反応溶液A 0.35ml、前記GSH 溶液0.1ml および前記ヨード酢酸ナトリウム溶液0.1ml をこの順序で添加し、この混合液に前記過酸化水素溶液0.05ml を添加することにより、酸化還元反応を開始した。そして、20秒間反応させた後、この反応液の波長726nmの吸光度を、日立U-3300分光光度計(日立製作所製)を用いて5分間測定した。また、比較例として、ヨード酢酸ナトリウム無添加の場合の吸光度を測定した。これは、前記ヨード酢酸ナトリウム溶液のかわりに、同量の前記Bicine 処理液を用いた以外は、前述の操作方法と同様に測定した。これらの結果を下記表1に示す。

【0048】また、前記操作方法より得られた吸光度と、添加した過酸化水素量に相当する吸光度の理論値と

時間(秒)	吸光度(Abs.)	
	実施例1	比較例1
0	0.240	0.184
50	0.238	0.170
100	0.237	0.160
150	0.235	0.147
200	0.234	0.134
250	0.232	0.126
300	0.230	0.118

【0052】前記表1に示すように、実施例では、ヨード酢酸ナトリウムおよびBicineを、GSHに添加することによって、安定した吸光度を得ることができた。また、反応後300秒経過した時点での実施例の吸光度(Abs.=0.23)は、前記吸光度の理論値(Abs.=0.27)に近い値であった。この結果から、ヨード酢酸ナトリウムとBicineとを用いた処理により、試料中のGSHおよびヨード酢酸ナトリウムの影響が十分に排除され、正確に測定できたことがわかる。これに対し、比較例では、GSHの影響が排除されていないため、その吸光度は時間の経過に伴って減少し、正確な測定ができなかった。

【0053】(実施例2および比較例2) この実施例は、還元物質を含む溶血試料に、ヨード酢酸ナトリウムおよびBicineを添加した例である。なお、測定対象物は、過酸化水素である。この実施例で用いた試料および酸化還元反応を用いた測定の操作方法を下記に示

【0044】(過酸化水素溶液) 純水に、過酸化水素(三徳化学社製、以下同じ)を60μmol/リットルの濃度になるように添加して調製した。

【0045】(酸化還元反応溶液A) 純水に、下記試薬を下記濃度になるように添加して調製した。

28.6KU/リットル

0.246mmol/リットル

を比較することにより、前記操作方法による測定の精度を評価した。前記理論値は、下記の式から求めた。下記式において、Aは吸光度、εは発色物質のモル吸光係数、cは反応液中の測定対象物のモル濃度(mol/リットル)、lは、吸光層の厚み(cm)をそれぞれ示す。

【0049】

【数1】 $A = \epsilon \times c \times l$

【0050】前記測定条件において、発色物質DA-64のモル吸光係数(ε)は90000、過酸化水素のモル濃度(c)は3μmol/リットル、吸光層の厚み(l)は1cmであり、これらの数値を代入し、前記式より求めた前記吸光度(A)の理論値は、0.27である。

【0051】

【表1】

す。

【0054】(試料) 健常者の全血を3000rpmで30分間遠心分離し、その血球画分を分離した。これを1% Triton X-100(和光純薬社製、以下同じ)溶液で10倍(v/v)希釈し、室温で攪拌することにより溶血処理を行った後、これを前記Bicine 処理液で20倍(v/v)希釈し、溶血試料とした。

【0055】(操作方法) 前記試料1.0mlに、前記1.0mmol/リットルのヨード酢酸ナトリウム溶液0.2ml および実施例1と同じ酸化還元反応溶液A 0.7ml をこの順序で添加し、37℃で2分間インキュベートした。そして、この混合液に240μmol/リットルの過酸化水素溶液0.1ml を添加することにより、酸化還元反応を開始し、3分間の吸光度を測定した。なお、測定は、同試料について、5回(n=5)行った。また、比較例として、ヨード酢酸ナトリウム無添加の場合の吸光度を測定した。これは、前記ヨード酢酸

ナトリウム溶液のかわりに同量の前記Bicine処理液を用いた以外は、前述の操作方法と同様にして測定した。これらの結果を図1のグラフに示す。同図中のaは、実施例の各吸光度 ($n=5$) を示し、bは、比較例の吸光度を示す。

【0056】図1のグラフに示すように、実施例では、反応終了後、時間が経過しても安定した吸光度が得られた。これに対し、比較例では、還元物質の影響が排除されていないため、その吸光度は時間の経過にともなって減少し、安定した吸光度が得られなかった。

【0057】(実施例3および比較例3) この実施例は、実施例2と同様に、還元物質を含む血球試料に、ヨード酢酸ナトリウムおよびBicineを添加した例である。なお、測定対象物は、糖アミノ酸であるフルクトシルバリン (以下「FV」という) および血球中の糖タンパク質である。この実施例で用いた試薬等の組成および酸化還元反応を用いた測定の操作方法を下記に示す。

【0058】(FAOD溶液) 純水に、FAOD (27.8 U/mg: 旭化成社製、以下同じ) を1.0 KU/リットルの濃度になるように添加して調製した。

【0059】(FV溶液) 純水に、FVを2.0 mmol/リットルの濃度になるように添加して調製した。

【0060】(操作方法) 実施例2と同様にして調製した溶血試料0.8 mlに、前記0.1 mol/リットルのヨード酢酸ナトリウム溶液0.2 ml、実施例1と同じ酸化還元反応溶液A0.7 mlおよび前記FAOD溶液0.15 mlをこの順序で添加した。そして、この混合液に前記FV溶液0.15 mlを添加し、この反応液の726 nmの吸光度を、前記分光光度計により30分間測定した。また、比較例として、ヨード酢酸ナトリウム無添加の場合の吸光度を測定した。これは、前記ヨード酢酸ナトリウム溶液のかわりに同量の前記Bicine処理液を用いた以外は、前述の操作方法と同様にして測定した。これらの結果を図2のグラフに示す。同図中のcは、実施例の吸光度を示し、dは、比較例の吸光度を示す。

【0061】図2のグラフに示すように、実施例では、反応終了後、時間が経過しても安定した吸光度を得ることができた。これに対し、比較例では、還元物質の影響が排除されていないため、その吸光度は低かった。

【0062】(実施例4) この実施例は、ヨード酢酸ナ

トリウムおよびBicineを3つの順序 (a、b、c) で試料に添加した例である。まず、添加順序aは、ヨード酢酸ナトリウムおよびBicine存在下で血球の溶血を行った例、添加順序bは、溶血試料をヨード酢酸ナトリウムで処理した後、Bicineで処理した例、添加順序cは、溶血試料をBicineで処理した後、ヨード酢酸ナトリウムで処理した例である。これらの添加順序a、bおよびcにおいて用いた試薬の組成および酸化還元反応を用いた測定の具体的操作方法を下記に示す。

【0063】(FAOD溶液) 純水に、前記FAODを2.0 KU/リットルの濃度になるように添加して調製した。

【0064】(添加順序a) 実施例2と同様にして分離した血球画分0.01 mlに、前記Bicine処理液0.65 mlを添加した後、この混合液に、前記Triton X-100溶液0.04 mlおよび1 mol/リットルのヨード酢酸ナトリウム溶液0.2 mlを同時に添加し、前処理を行った。この前処理後の混合液に、実施例1と同じ酸化還元反応溶液A0.7 mlおよび前記FV溶液0.2 mlをこの順序で添加した。そして、前記FAOD溶液0.2 mlを添加し、この反応液の726 nmの吸光度を、前記分光光度計により測定した。前記反応開始12分後および20分後の吸光度を下記表2に示す。

【0065】(添加順序b) 添加順序aと同じ血球画分0.01 mlに、前記Triton X-100溶液0.04 mlおよび前記ヨード酢酸ナトリウム溶液0.2 mlを同時に添加した後、前記Bicine処理液0.65 mlを添加して前処理を行った以外は、添加順序aの操作方法と同様にして測定を行った。この結果も下記表2に併せて示す。

【0066】(添加順序c) 添加順序aと同じ血球画分0.01 mlに、前記Triton X-100溶液0.04 ml、前記Bicine処理液0.65 mlおよび前記ヨード酢酸ナトリウム溶液0.2 mlをこの順序で添加して前処理を行った以外は、添加順序aの操作方法と同様にして測定を行った。この結果も下記表2に併せて示す。

【0067】

【表2】

吸光度 (Abs.)

添加順序	12分後	20分後
a	1.25	1.60
b	1.40	1.60
c	1.60	1.60

【0068】前記表2に示すように、添加順序a、bおよびcの反応20分後のそれぞれの吸光度は、ほぼ同じ値が得られ、その吸光度も安定していた。これらの結果から、十分な反応時間をとれば、血球の溶血処理、ヨ-

ード酢酸ナトリウムによる処理およびBicineによる処理は、その順序に特に制限されないといえる。また、これらの添加順序の中でも添加順序cの吸光度は、反応12分後において、反応20分後と同じ吸光度に達して

いた。この結果から、添加順序cのように、まず溶血試料をヨード酢酸ナトリウムで処理してからBicineで処理すれば、迅速に測定でき、特に好ましいといえる。

【0069】(実施例5) この実施例は、試料に対して、3種類の濃度のヨード酢酸ナトリウムと一定濃度のBicineとを添加した例である。この実施例で用いた試薬等の組成ならびに酸化還元反応を用いた測定の操作方法を下記に示す。

【0070】(ヨード酢酸ナトリウム溶液) 純水に、前記ヨード酢酸ナトリウムを、0.2775mol/リットル、0.4mol/リットルおよび0.6mol/リットルの3種類の濃度になるように添加して調製した。

【0071】(操作方法) 実施例2と同様にして分離した血球画分0.01mlに、前記TritonX-10

ヨード酢酸ナトリウム濃度

(mol/リットル)

0.2775

0.4

0.6

【0073】前記表3に示すように、前記各濃度のヨード酢酸ナトリウム溶液および一定濃度の前記Bicine処理液により前記溶血試料を処理した結果、各吸光度は、均一な値を示した。

【0074】

【発明の効果】以上のように、本発明の方法によれば、還元物質が存在する試料であっても、前記試料の測定対象物を高精度で測定できる。このため、本発明の方法

0溶液0.04mlを添加し、室温で攪拌したものを、溶血試料とした。前記各濃度のヨード酢酸ナトリウム溶液0.02ml各々と前記溶血試料0.05mlとを混合した後、これらの各混合液に、前記Bicine処理液0.65ml、実施例1と同じ酸化還元反応溶液A 0.70mlおよび前記FV溶液0.2mlをこの順序で添加した。そして、これらの混合液各々に実施例4と同じFAOD溶液0.2mlを添加して、これらの反応液の726nmの吸光度を、前記分光光度計により測定した。各ヨード酢酸ナトリウム濃度において、前記酸化還元反応が終了し、吸光度が安定した前記反応開始12分後の吸光度の結果を下記表3に示す。

【0072】

【表3】

吸光度 (Abs.)
1.35
1.35
1.35

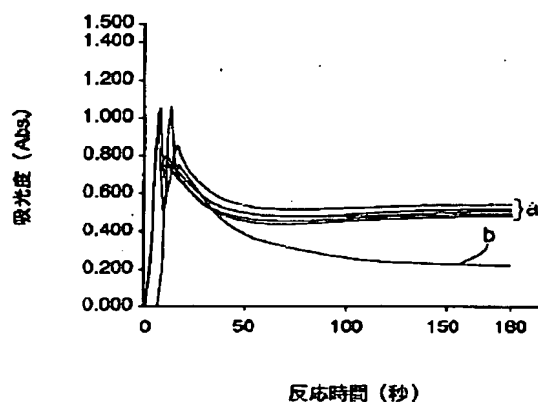
を、例えば、赤血球中のHbA1cの測定に適用すれば、従来より測定精度が向上し、HbA1cの糖尿病診断等の指標物質としての重要性がさらに向上する。

【図面の簡単な説明】

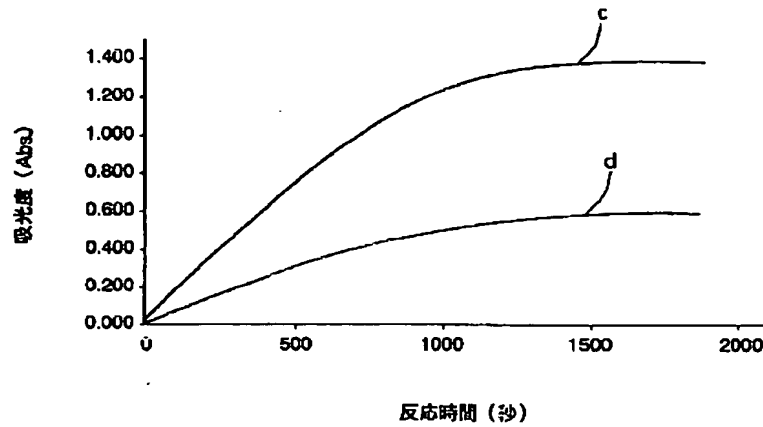
【図1】本発明の一実施例において、酸化還元反応時間と吸光度との関係を示すグラフである。

【図2】本発明のその他の実施例において、酸化還元反応時間と吸光度との関係を示すグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷
// G 0 1 N 1/28

識別記号

F I
G 0 1 N 1/28

(参考)

J

Fターム(参考) 2G042 BB11 BD19 BE03 BE04 CB03
DA03 DA08 EA01 FA04 FA05
FA11 FA17 FB02 GA01 GA05
2G045 AA01 BA13 BB01 BB10 BB18
BB29 BB39 BB50 BB51 CA02
CA25 DA36 DA44 DA48 DB04
DB21 FA11 FA29 FB01 FB11
GC10 GC18
2G054 AA07 AB10 BA01 BB01 BB10
BB13 CA21 CA25 CB03 CD01
EA04 EB01 GB01
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ16 QQ67
QQ68 QQ79 QQ89 QR16 QR41
QR48 QR64 QR66 QS20 QX01